

تاثیر سمی ترکیب آلیسین و متیل سولفونیل متان بر روی بقای رده‌ی سلولی سرطان سینه (MCF7)

الهام سرخانی^۱، دکتر نوروز نجف زاده^۲، دکتر محمد مازنی^۳، دکتر محسن ارزنلو^۴، دکتر علیرضا محمدزاده^۵

نویسنده‌ی مسوول: گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل n.najafzade@arums.ac.ir

دریافت: ۹۴/۵/۱۹ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: سرطان سینه یکی از سرطان‌های شایع زنان محسوب می‌شود. بیشتر سلول‌های سرطان سینه گیرنده‌ی استروژن $ER-\alpha$ را بیان می‌کنند و به داروهای شیمی درمانی ضد استروژن از جمله تاموکسیفن پاسخ می‌دهند، اما برخی از سلول‌های سرطان سینه به شیمی درمانی مقاومت دارویی نشان می‌دهند. مطالعات اولیه نشان می‌دهد که آلیسین از مشتقات ارگانوسولفور می‌باشد و در القای آپوپتوز و مرگ سلولی در رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی موثر می‌باشد. متیل سولفونیل متان ترکیب غیرسمی برای بدن انسان است که تاثیر سمی آن بر روی چندین رده‌ی سرطانی بررسی شده است. هدف این مطالعه، بررسی تاثیر آلیسین و متیل سولفونیل متان و یا ترکیب آن‌ها بر روی تکثیر رده‌ی سلولی سرطان سینه (MCF7) است.

روش بررسی: در این مطالعه رده‌ی سلولی سرطان سینه در محیط RPMI-1640 کشت داده شد، سلول‌های $CD44^{+}$ با روش مکس جدا شد و تحت تاثیر رقت‌های مختلف آلیسین و ترکیب آن با متیل سولفونیل متان قرار گرفت و مرگ سلولی با روش‌های MTT ، ارزیابی کلونی و رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید بررسی شد.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان داد که آلیسین به تنهایی تاثیر سمی بر روی مرگ سلولی سرطان سینه دارد و ترکیب درمانی آلیسین با متیل سولفونیل متان باعث افزایش سمیت و تعداد سلول‌های آپوپتوز شده نسبت به بقیه‌ی گروه‌ها شد ($P < 0.05$). در ارزیابی کلونوژنیک تعداد کلونی کمتری در ترکیب آلیسین با متیل سولفونیل متان در گروه سلولی $CD44^{+}$ نسبت به گروه $CD44^{+}$ مشاهده شد که نشان دهنده‌ی حساسیت بیشتر سلول‌های $CD44^{+}$ نسبت به سلول‌های بنیادی $CD44^{+}$ بود.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه ما نشان دادیم که آلیسین و متیل سولفونیل متان اثرات ضد سرطانی دارد و ترکیب غلظت پایین آلیسین و متیل سولفونیل تاثیر بهتری در سرکوب سرطان سینه دارد. بنابراین آلیسین و متیل سولفونیل به عنوان ترکیبات طبیعی هستند و می‌توانند جهت اهداف درمانی پزشکی مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: آلیسین، متیل سولفونیل متان، سرطان سینه، آپوپتوز، ارزیابی کلونی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل

۲- دکترای تخصصی علوم تشریحی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل

۳- دکترای تخصصی بیوشیمی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل

۴- دکترای تخصصی میکروبی شناسی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل

۵- فوق تخصص جراحی قلب، استادیار گروه بیماری‌های قلب، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل

مقدمه

سرطان پستان بالاترین میزان شیوع را در بین زنان در سراسر دنیا داشته و دومین عامل عمده‌ی مرگ و میر ناشی از سرطان در بین زنان آمریکایی است (۱). در بین زنان ایرانی نیز شیوع این سرطان در حال افزایش است و زنان ایرانی ۱۰ سال زودتر از زنان کشورهای پیشرفته دچار سرطان سینه می‌شوند (۲). روش‌های رایج شیمی درمانی و پرتو درمانی سلول‌های تمایز یافته را مورد هدف قرار می‌دهند، اما در حقیقت این سلول‌ها بخش اعظم حجم تومور را تشکیل می‌دهند و در پیشرفت و رشد تومور نقش ندارند (۳). اغلب از داروهای شیمی درمانی به نام آنتراسیکلین‌ها و تاکسان‌ها جهت درمان این بیماران استفاده می‌شود. ۸۵ درصد سلول‌های سرطان سینه ER- α مثبت بوده و تحت تاثیر هورمون‌های استروئیدی قرار می‌گیرند که چنین سلول‌هایی معمولاً با داروهای ضد استروئیدی همچون تاموکسیفن از بین می‌روند. علیرغم پیشرفت‌های زیاد در درمان سرطان سینه، در بسیاری از موارد عود بیماری منجر به مرگ می‌شود، بنابراین مطالعه‌ی اثر داروهای جدید یک اولویت مهم در از بین بردن سلول‌های سرطانی محسوب می‌شود. جمعیتی از سلول‌ها در توده‌های سرطانی بدن یافت شده است که ویژگی‌های مربوط به سلول‌های بنیادی عادی را دارا هستند که به سلول‌های بنیادی سرطانی معروفند. سلول‌های بنیادی سرطانی دارای توانایی خودنوسازی، ایجاد انواع دودمان‌های سلولی، و تکثیر به صورت نامحدود را دارند و در تومور به‌عنوان جمعیتی مجزا باقی مانده، با تقسیمات متوالی سبب عود تومور، متاستاز و ایجاد تومورهای جدید می‌شوند (۴). بررسی‌های زیادی جهت شناسایی مارکرهای مولکولی که مختص این جمعیت سلولی باشد انجام شده است (۵). یکی از مهم‌ترین مارکرها، که در سلول‌های سرطان پستان نیز حایز اهمیت است، مارکر CD۴۴ می‌باشد. CD۴۴ خانواده‌ای از گلیکوپروتئین‌های سطح سلول است که توسط ژن واحدی بر

روی کروموزوم ۱۱ بیان می‌شود و در اتصالات سلولی، تعاملات سلول-ماتریکس و مهاجرت و جایگزینی سلول نقش دارد (۶). بررسی‌ها ارتباط معنی‌داری بین افزایش بیان CD۴۴ و عود تومور و میزان مرگ و میر نشان داده‌اند. مشخص شده‌است این مارکر در دو مسیر تهاجمی شامل اتصال به ماتریکس خارج سلولی و تحرک سلول‌های سرطانی نقش مهمی دارد و بالا بودن غلظت سرمی آن در بیماران مبتلا به سرطان معده پیشرفته و سرطان پستان نیز مشاهده شده‌است (۷). یکی از مکانیسم‌های دفاعی سلول‌ها در برابر سرطانی شدن آپوپتوز و مرگ برنامه‌ریزی شده می‌باشد. هر عامل مهار کننده‌ی آپوپتوز می‌تواند به‌عنوان عامل مهمی در بروز سرطان مورد توجه قرار گیرد و مقاومت به آن از مهم‌ترین مشکلات درمان‌های حال حاضر در جهت درمان سرطان‌ها است (۸). بررسی‌ها نشان داده‌اند که رژیم غذایی می‌تواند به‌عنوان فاکتورهای ضد سرطانی در مهار سرطان سینه عمل کنند (۹). در سال‌های اخیر استفاده از درمان‌های مکمل گیاهی در درمان سرطان‌ها مورد توجه قرار گرفته است و از زمان‌های باستان هم، سیر در جهت درمان بعضی بیماری‌ها مورد استفاده بوده است. مصرف سیر با کاهش خطر ابتلا به سرطان در ارتباط است. بسیاری از ترکیبات ارگانوسولفور، عوامل اصلی موجود در سیر هستند که باعث مهار تکثیر سلول‌های سرطانی و القای آپوپتوز در آن‌ها می‌شوند. مطالعات نشان داده است که خطر بروز سرطان سینه با افزایش مصرف سیر کاهش می‌یابد (۱۰). یکی از فعال‌ترین ترکیبات بیولوژیکی موجود در سیر تازه له شده، آلیسین است که دارای خواص ضد باکتریایی (۱۱ و ۱۲)، ضد قارچی، ضد ویروسی بوده و می‌تواند در کاهش تجمع پلاکتی، بیوستز کلسترول و نیز به‌عنوان گشاد کننده‌ی عروق عمل کند (۱۳-۱۵). اثرات ضد سرطانی آلیسین به توقف چرخه‌ی سلولی و القای آپوپتوز از طریق تنظیم تغییر در بیان پروتئین‌های تنظیم کننده‌ی آپوپتوز در سلول‌های توموری مربوط می‌شود (۱۶). متیل سولفونیل متان (MSM)

یا دی متیل سولفان در مغز انسان (۱۷) پلاسمای خون و مایع مغزی-نخاعی به مقدار کم یافت می‌شود و ترکیبی است که از اکسیژن، سولفور و گروه‌های متان تشکیل شده است. متیل سولفونیل متان موجود در مواد غذایی به آسانی در طی پختن از بین می‌رود (۱۸).

مصرف متیل سولفونیل متان با بهبود فعالیت جسمانی و کاهش خطر ابتلا به سرطان‌ها همراه است و به نظر می‌رسد که عملکرد آن به فعالیت ضد التهابی و آنتی اکسیدانی آن مرتبط باشد. این ماده دارای چندین اثر سایتوتوکسیک است، و تاثیر آن بر سرطان‌های معده، کبد، مری و پستان بررسی شده است (۲۰ و ۱۹). اخیراً مطالعاتی جهت کاهش مقاومت سلول‌های سرطانی به شیمی درمانی انجام شده که با موفقیت نیز همراه بوده است. با توجه به نقش مهم آلیسین و متیل سولفونیل متان در از بین بردن سلول‌های سرطانی، بر آن شدیم تا اثرات ضد سرطانی آلیسین و متیل سولفونیل متان و ترکیب آن‌ها را بر روی مرگ سلولی سلول‌های بنیادی $CD44^+$ و سلول‌های غیر بنیادی $CD44^-$ رده‌ی سرطان پستان (MCF7) بررسی نماییم.

روش بررسی

مواد: جهت انجام این مطالعه‌ی تجربی، ماده‌ی آلیسین استاندارد در آزمایشگاه طبق روش ذکر شده در ذیل استخراج شد و متیل سولفونیل متان از شرکت فلوکا (شماره کاتالوگ ۴۱۶۳۱) خریداری شد.

استخراج، تغلیظ و اندازه‌گیری آلیسین: حبه سیرها بعد از شستشو توسط هاون کوبیده و له شدند، سپس توسط هموژنایزر به‌طور کامل هموژنیزه و در نهایت خمیر به دست آمده از عصاره‌ی سونیکه شده میان ۵ لایه گاز استریل عبور داده شد. به منظور جداسازی اجزای شناور به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. سوپرناتانت به‌دست آمده جهت حذف پروتئین‌ها با حجم برابر متانول

مخلوط و مجدداً سانتریفیوژ گردید و در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. استخراج آلیسین با استفاده از روش HPLC نیمه کمی انجام شد (۲۰). به این ترتیب که ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره‌ی متانولی سیر (۵۰/۵۰ حجمی/حجمی) به سیستم HPLC مجهز به یک ستون نیمه کمی با اندازه ۱/۵ در ۱ سانتی‌متر (شرکت تکنوکوما، بارسلونا، اسپانیا) تزریق شد. فاز متحرک مخلوط ۵۰/۵۰ حجمی/حجمی متانول و آب بود. کروماتوگرافی در دمای اتاق با سرعت ۲ میلی‌لیتر در دقیقه انجام شد. آلیسین خروجی در طول موج ۲۲۰ نانومتر شناسایی شد. پیک حاوی آلیسین در لوله فالكون جمع‌آوری و توسط فریز درایر تغلیظ شد.

میزان آلیسین بعد از تغلیظ با استفاده از روش HPLC آنالیتیکال مطابق کارهای قبلی نویسندگان تعیین شد (۲۱) و محلول آبی آلیسین برای استفاده‌های بعدی در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. در این مطالعه از آلیسین تجاری با درجه خلوص ۹۹/۳۹ درصد به‌عنوان استاندارد استفاده شد.

کشت سلولی: رده‌ی سلولی MCF7 از شرکت انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در محیط RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱ درصد محلول آنتی بیوتیک پنی‌سیلین/ استرپتومایسین (جیبکو) کشت داده شد و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد نگهداری گردید.

روش MTT: میزان بقای سلولی با روش MTT بررسی شد. برای انجام MTT سلول‌ها در غلظت 1×10^4 سلول در ۲۰۰ میکرولیتر در داخل پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوبه، محیط آسپیره گردید و ردیف اول پلیت ۹۶ خانه به‌عنوان بلانک، ردیف دوم به‌عنوان کنترل و ردیف‌های بعدی به‌ترتیب با غلظت‌هایی برابر ۰/۱۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر آلیسین به‌تنهایی، و نیز متیل سولفونیل متان به‌تنهایی تیمار داده شد. در این

IC50 ۳/۴ و IC50 ۱/۲ آلیسین به مدت ۴ ساعت تیمار شدند.

(ب) گروه سلول‌های $CD44^{\pm}$ به مدت هفت روز با ترکیب متیل سولفونیل متان (۳۰۰ میلی‌مولار تیمار ۲۴ ساعته) و آلیسین (دوزهای IC50 ۳/۴، IC50 ۱/۲ و IC50 ۱) (به مدت ۴ ساعت) تیمار شدند (جدول ۱).

گروه‌هایی که جهت بررسی مرگ سلولی استفاده شد:

(الف) گروه سلول‌های کنترل $CD44^{\pm}$ که به مدت هفت روز تحت تاثیر هیچ گونه دارویی قرار نگرفتند.

(ب) گروه سلول‌های $CD44^{\pm}$ که تحت تاثیر غلظت IC50، متیل سولفونیل متان قرار گرفتند.

(ج) گروه سلول‌های $CD44^{\pm}$ که تحت تاثیر غلظت های IC50، آلیسین قرار گرفتند.

(د) گروه سلول‌های $CD44^{\pm}$ که با غلظت IC50، متیل سولفونیل متان به مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و سپس تحت تاثیر غلظت‌های IC50 ۳/۴، IC50 ۱/۲ و IC50 آلیسین قرار گرفتند (جدول ۱).

ارزیابی مورفولوژی سلولی برای آپوپتوز: گروه سلول‌های $CD44^{\pm}$ در فلاسک‌های T25 کشت داده شدند، سپس توسط تریپسین/ایدتا جدا شده و تعداد ۱۰۰۰ سلول در هر خانه پلیت شش خانه اضافه شد، بعد از ۲۴ ساعت انکوبه، سلول‌ها به شش گروه تقسیم شدند و با غلظت‌های مختلف آلیسین و متیل سولفونیل متان تیمار شدند (شکل ۱ و ۲). بعد از گذشت ۱۰ روز سلول‌ها با متانول ۵/۵ درصد فیکس و با کریستال ویوله ۵/۵ درصد رنگ آمیزی شدند. سپس از کلونی‌های سلولی به دست آمده با میکروسکوپ معکوس (Invert) تصاویری تهیه شد و کلونی‌های با بیش از ۵۰ سلول با برنامه Image J شمارش شدند. سلول‌ها از نظر ظاهری بزرگتر بررسی شدند و تعداد کلونی‌ها مورد بررسی قرار گرفت (۲۴).
گروه‌هایی که در ارزیابی کلونی استفاده شد: (الف) گروه سلول‌های $CD44^{\pm}$ به مدت هفت روز با دوزهای IC50

مرحله از محیط کشت بدون FBS استفاده گردید و دوباره سلول‌ها به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه گردیدند. در حالت ترکیبی تیمار ۴ ساعته با مقدار IC50 متیل سولفونیل متان و ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف آلیسین انجام شد (۲۱). در پایان، محیط کشت آسپیره و ۱۸۰ میکرولیتر محیط بدون سرم و ۲۰ میکرولیتر از رنگ MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر ول اضافه گردید و پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت دیگر انکوبه شدند. بعد از آن محیط رویی آسپیره، ۱۵۰ میکرولیتر از محلول دی متیل سولفوکسید به هر ول اضافه گردید و پلیت‌ها به مدت ۱۰ دقیقه شیک شده و جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزاریدر اندازه‌گیری شد. در نهایت میزان بقای سلولی در پلیت ۹۶ خانه با استفاده از فرمول ۱ محاسبه و میزان IC50 با برنامه سیگما پلات نسخه ۱۲ محاسبه شد (۲۳ و ۲۲). فرمول ۱:

$$\text{میانگین جذب نمونه} = \frac{\text{میانگین جذب کنترل}}{\text{درصد سلول های زنده}}$$

ارزیابی کلونی با شمارش کلونی: برای ارزیابی کلونی، سلول‌ها را پس از جدا کردن با تریپسین با محیط کشت شستشو داده و تعداد ۱۰۰۰ سلول در میلی‌لیتر به هر خانه پلیت شش خانه اضافه شد، بعد از ۲۴ ساعت انکوبه، سلول‌ها به شش گروه تقسیم شدند و با غلظت‌های مختلف آلیسین و متیل سولفونیل متان تیمار شدند (شکل ۱ و ۲). بعد از گذشت ۱۰ روز سلول‌ها با متانول ۵/۵ درصد فیکس و با کریستال ویوله ۵/۵ درصد رنگ آمیزی شدند. سپس از کلونی‌های سلولی به دست آمده با میکروسکوپ معکوس (Invert) تصاویری تهیه شد و کلونی‌های با بیش از ۵۰ سلول با برنامه Image J شمارش شدند. سلول‌ها از نظر ظاهری بزرگتر بررسی شدند و تعداد کلونی‌ها مورد بررسی قرار گرفت (۲۴).
گروه‌هایی که در ارزیابی کلونی استفاده شد: (الف) گروه سلول‌های $CD44^{\pm}$ به مدت هفت روز با دوزهای IC50

یافته‌ها

مقدار IC50 و میزان بقای سلولی: میزان حیات سلول‌های CD44⁺ پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون روند کاهشی از خود نشان می‌دهند که این روند کاهشی متناسب با دوز آلیسین و متیل سولفونیل متان می‌باشد به‌طوری که در دوزهای بالا میزان حیات سلولی، کاهش زیادی در مقایسه با دوزهای کمتر از خود نشان می‌دهد (جدول ۱) ($P < 0.05$).

می‌شوند. سلول‌های سالم به رنگ سبز پررنگ و سلول‌های نکروتیک با رنگ زرد متمایل به قرمز و هسته دست نخورده قابل شناسایی هستند (۲۵).

تجزیه و تحلیل آماری: اطلاعات به دست آمده از شمارش کلونی‌ها با نرم افزار SPSS و تست‌های آماری ANOVA و تست تکمیلی Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفتند و میزان IC50 تاثیر داروها با برنامه Sigmaplot11 تعیین گردید.

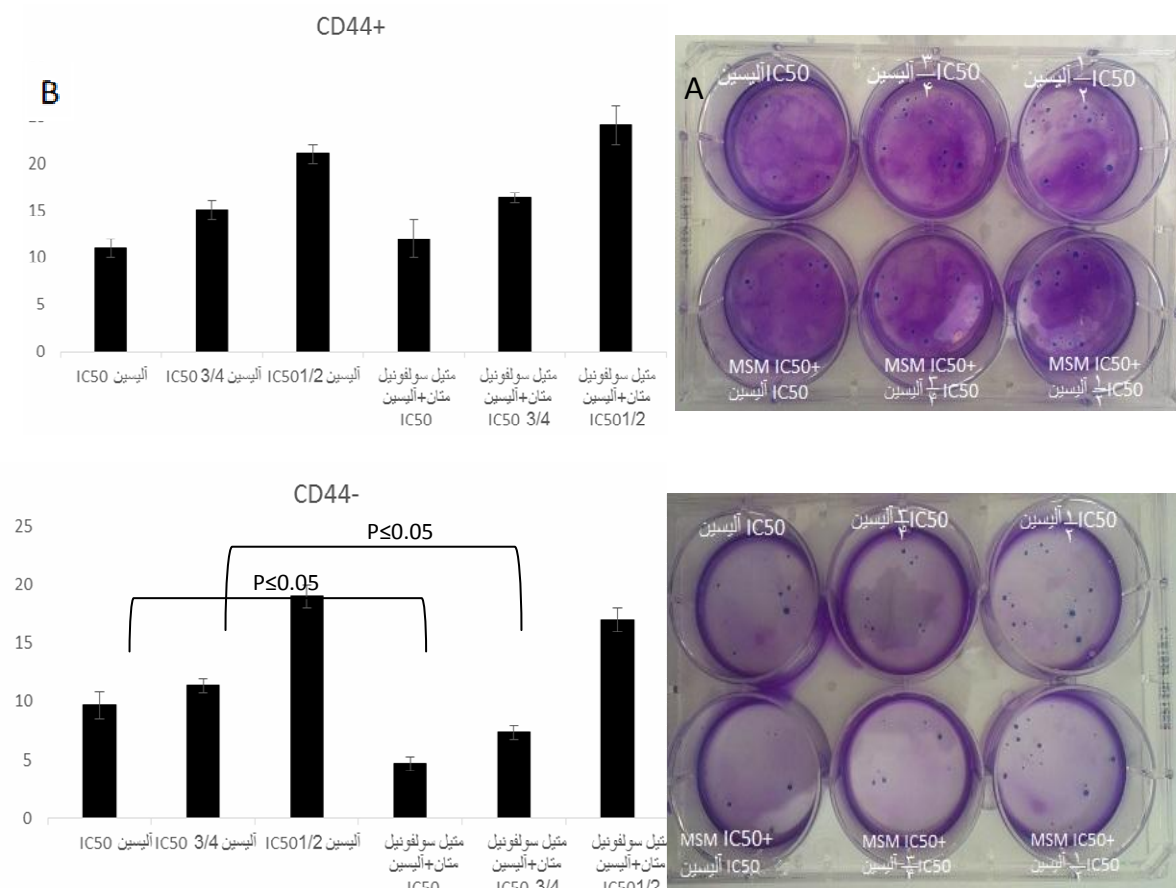
جدول ۱: مقادیر IC50 و IC50 ۳/۴ و IC50 ۱/۲ به دست آمده از اثر غلظت‌های مختلف آلیسین و متیل سولفونیل متان و ترکیب دو ماده بر روی سلول‌های CD44⁺ رده‌ی MCF7 با روش MTT (۲۴ ساعته). مقادیر آلیسین بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر و

مقادیر متیل سولفونیل متان بر حسب میلی‌مولار می‌باشد

CD44 ⁺	CD44 ⁻	
۴۱/۵۸ میکروگرم بر میلی لیتر	۹/۶۱ میکروگرم بر میلی لیتر	آلیسین (IC50)
۳۱/۱۸ میکروگرم بر میلی لیتر	۷/۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر	آلیسین IC50 ۳/۴
۲۰/۷۹ میکروگرم بر میلی لیتر	۴/۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر	آلیسین IC50 ۱/۲
۲۸۳/۳۲ میلی مول	۳۶۶/۲ میلی مول	متیل سولفونیل متان
۶۰/۵۲ میکروگرم بر میلی لیتر	۵۶/۶۱ میکروگرم بر میلی لیتر	ترکیب آلیسین و متیل سولفونیل متان

تیمار با آلیسین به تنهایی شد و نتایج به دست آمده معنادار بود، در حالی که در گروه CD44⁺ تفاوت چندانی بین حالت ترکیبی و آلیسین به تنهایی مشاهده نشد. بیشترین کاهش کلونی‌ها در گروه CD44⁺ پس از تیمار با غلظت IC50، آلیسین مشاهده شد (شکل ۱ و ۲).

ارزیابی تعداد کلونی: ارزیابی تعداد کلونی‌ها با رنگ آمیزی کریستال ویوله نشان داد که سلول‌های CD44⁻ مقاومت کمتری در برابر غلظت‌های مختلف آلیسین و ترکیب دو دارو نسبت به سلول‌های CD44⁺ داشتند (شکل ۲). در این گروه تیمار با ترکیب دو دارو باعث کاهش تعداد کلونی‌ها نسبت به



شکل ۱ و ۲: تاثیر غلظت‌های مختلف آلیسین و ترکیب آن با متیل سولفونیل متان روی کلونی‌زایی گروه سلول‌های بنیادی $CD44^+$ و غیر بنیادی $CD44^-$ رده $MCF7$ شکل A و C تعداد کلونی‌های شکل گرفته و شکل B و D میانگین تعداد کلونی‌ها را بعد از تیمار با غلظت‌های مختلف آلیسین و ترکیب آن با متیل سولفونیل متان نشان می‌دهد.

بررسی مرگ سلولی: نتایج نشان داد که در هر دو گروه $CD44^+$ پس از تیمار مرگ سلولی مشاهده می‌شود. در هر دو گروه درصد سلول‌های نکروتیک در ترکیب آلیسین ($IC50$) و متیل سولفونیل متان ($IC50$) افزایش معناداری نسبت به گروه‌های کنترل و تیمار به تنهایی با آلیسین و متیل سولفونیل متان داشت. در سلول‌های $CD44^+$ ترکیب دو دارو با افزایش سلول‌های آپوپتوتیک نسبت به آلیسین به تنهایی و

معنادار بود. درصد سلول‌های آپوپتوتیک در هر دو گروه در تیمار با متیل سولفونیل متان به تنهایی بیشتر از آلیسین به تنهایی بود. بهترین نتیجه در هر دو گروه مربوط به ترکیب غلظت‌های $IC50$ آلیسین و متیل سولفونیل متان بود که کمترین تعداد کلونی و سلول‌های زنده را داشتند (جدول ۲ و شکل ۳).

جدول ۲: درصد سلول‌های زنده، آپوپتوتیک و نکروتیک در گروه‌های مختلف درمان شده با غلظت‌های مختلف آلیسین، متیل سولفونیل متان و ترکیب متیل سولفونیل متان با دوزهای مختلف آلیسین

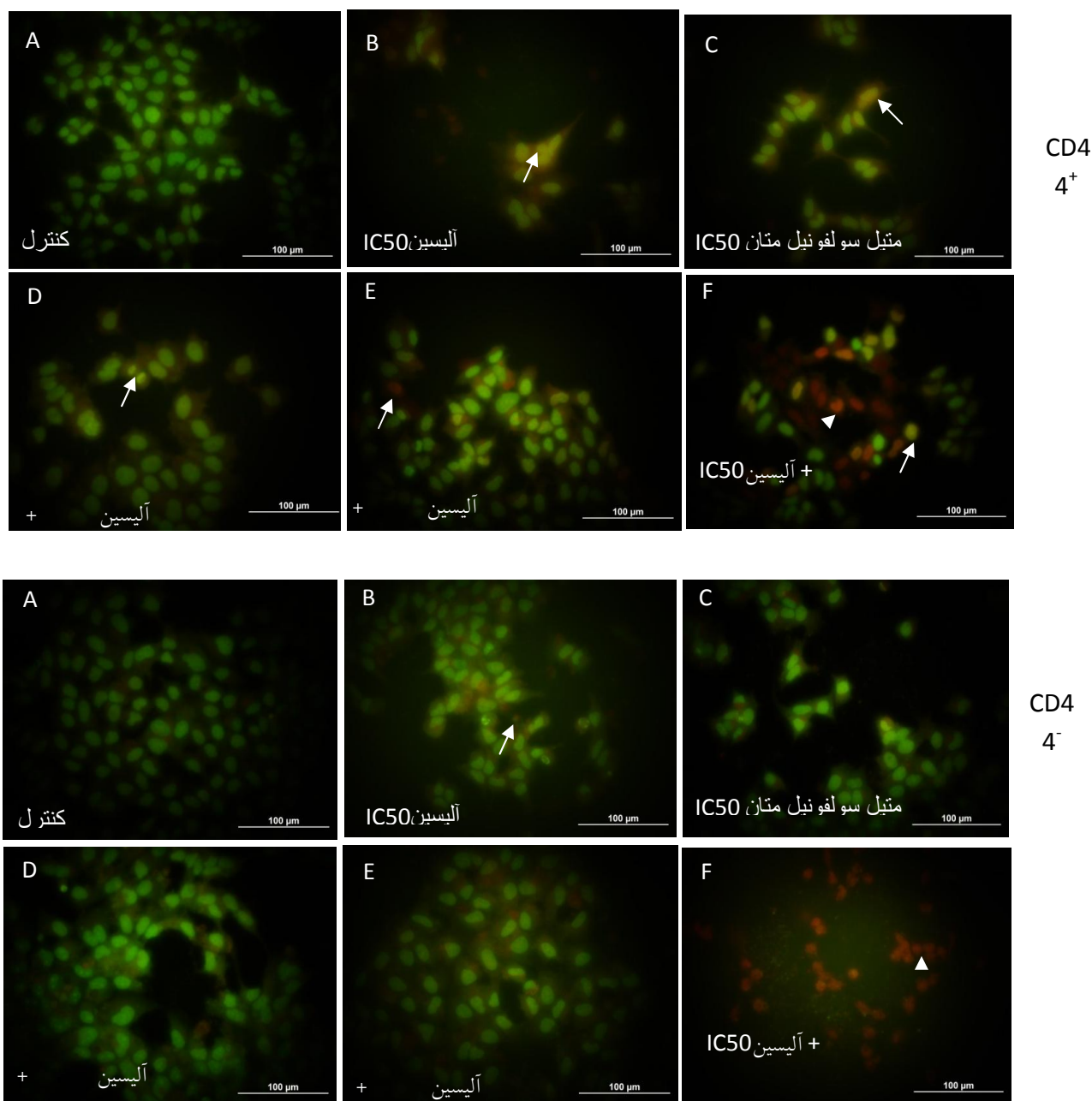
درصد سلول‌های MCF7	CD44 ⁺		CD44 ⁻		درصد سلول‌های نکروتیک	درصد سلول‌های نکروتیک
	درصد سلول‌های زنده	درصد سلول‌های آپوپتوتیک	درصد سلول‌های زنده	درصد سلول‌های آپوپتوتیک		
کنترل	۹۸/۳±۲/۹	۱/۷±۳/۶	۰/۰±۰/۰	۹۸/۲±۱/۶	۱/۸±۰/۱	۰/۰±۰/۰
آلیسین IC50	۶۱/۷±۲/۵	۲۷/۹±۱/۸	۱۰/۳±۰/۷	۵۷/۷±۲/۱	۲۰/۳±۵/۸	۲۱/۹±۷
متیل سولفونیل متان IC50	۶۲/۸±۶/۴	۳۳/۲±۱۰/۳	۴/۲±۱/۱	۵۹/۶۷/۷	۳۸/۳±۵/۰	۲/۴±۱/۸
آلیسین + IC50 متیل سولفونیل IC50 متان	۴۸/۳±۴/۴	۳۸/۵±۳/۸	۱۳/۲±۳/۱	۴۶/۴±۰/۵۶	۱۷/۵۶±۷/۸	۳۲/۶±۴/۴
آلیسین 3/4 IC50 + متیل سولفونیل متان IC50	۵۲/۳±۰/۰	۴۳/۲±۰/۰	۴/۶±۰/۰	۵۰/۱±۳/۱	۲۸/۳±۰/۵	۲۱/۵±۳/۷
آلیسین ۱/۲ IC50 + متیل سولفونیل متان IC50	۷۱/۵±۵/۶	۲۶/۶±۴/۸	۰/۷±۱/۶	۷۲/۹±۱۰/۷	۲۴/۶±۸/۷	۲/۴±۲/۶

بحث

رژیم غذایی نقش حیاتی را در ایجاد سرطان و نیز جلوگیری از آن ایفا می‌کند و فاکتور مهمی در بروز تقریباً ۴۰ درصد همه‌ی نئوپلازی‌های انسانی است. مطالعات اپیدمیولوژی و بررسی‌های تجربی نشان می‌دهند که ترکیبات سنتتیک و طبیعی رژیم غذایی می‌تواند به‌عنوان عوامل ضد سرطانی در مهار سرطان پستان عمل کنند (۹ و ۲۶). آلیسین مهم‌ترین مشتق سیر است که از غشای دولایه‌ای فسفولیپیدی عبور می‌کند و رشد رده‌های سلولی سرطان‌های پستان، اندومتريال و کولون را مهار می‌کند (۲۷ و ۲۰). اثرات ضد تکثیری آلیسین به‌توقف چرخه‌ی سلولی و توانایی آن برای کاهش سطوح گلوټاتیون داخل سلولی بیشتر از فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن نسبت داده شده است. همچنین آلیسین احتمالاً باعث القای آپوپتوز از طریق تغییر بیان پروتئین‌هایی

که تنظیم آپوپتوز را در سلول‌های توموری برعهده دارند، می‌شود (۲۶).

مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که متیل سولفونیل متان اثر مهاری زیادی روی رشد سلول‌های سرطان سینه ندارد ولی متیل سولفونیل متان با افزایش حساسیت سلول‌ها به آلیسین باعث القای آپوپتوز می‌شود. همچنین سلول‌های سرطانی بعد از درمان با غلظت IC50 متیل سولفونیل متان و آلیسین دچار آپوپتوز تاخیری و نکروتیک می‌گردند. این مطالعه نشان داد استفاده‌ی همزمان غلظت IC50 این دو دارو، باعث افزایش معنی‌دار درصد سلول‌های نکروتیک در هر دو گروه نسبت به تیمار به تنهایی این داروها شد. در سلول‌های بنیادی CD44⁺ افزایش درصد سلول‌های آپوپتوتیک در ترکیب دو دارو به طور معنی‌داری بیشتر از درصد این سلول‌ها در غلظت‌های IC50 آلیسین و متیل سولفونیل متان بود.



شکل ۳: رنگ آمیزی آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید گروه‌های سلولی $CD4^{+/-}$ رده‌ی *MCF7*، *A* کنترل، *B* غلظت *IC50* آلیسین، *C* غلظت *IC50* متیل سولفونیل متان، *D* غلظت‌های *IC50* متیل سولفونیل متان (۲۴ ساعت) و *IC50* آلیسین (۴ ساعت)، *E* غلظت‌های *IC50* متیل سولفونیل متان (۲۴ ساعت) و *IC50* آلیسین، *F* غلظت‌های *IC50* متیل سولفونیل متان (۲۴ ساعت) و *IC50* آلیسین (۴ ساعت). فلش‌ها سلول‌های آپوپتوتیک و نوک فلش سلول‌های نکروتیک را نشان می‌دهد.

استاندارد درمان سرطان سینه محسوب می‌شود اما مقاومت به این دارو شایع است و درمان با این دارو عوارض شدیدی را ایجاد می‌کند (۳۰). حساس‌سازی سلول‌های سرطانی سینه به داروهای شیمی درمانی لازم به نظر می‌رسد. استفاده همزمان از تاموکسیفن و آلیسین و متیل سولفونیل متان برای افزایش اثرات شیمی درمانی و یا کاهش عوارض آن از راه‌های پیشنهادی جهت درمان سرطان سینه می‌باشد. در این مطالعه برای اولین بار نشان داده شد که آلیسین و متیل سولفونیل متان به تنهایی و به صورت ترکیبی روی توقف رشد سلول‌های سرطانی تاثیر دارد. مطالعات قبلی هم تاثیر ضد سرطانی آلیسین و متیل سولفونیل متان را روی سلول‌های سرطان سینه نشان داده بودند ولی نکته جالب در این مطالعه آن است که این دو ماده توانسته است به تنهایی و در حالت ترکیب باعث مهار سلول‌های بنیادی $CD44^+$ شود.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که استفاده ترکیبی از آلیسین و MSM باعث افزایش مرگ برنامه ریزی شده‌ی کروتیک و آپوپتوتیک نسبت به استفاده به تنهایی از آلیسین و MSM شده و در نتیجه ترکیب این دو دارو می‌تواند در آینده به عنوان داروی کمکی در درمان سرطان سینه به کار گرفته شود.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان نامه دوره‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۰۱۲ مصوب شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل می‌باشد. این پایان‌نامه در آزمایشگاه کشت سلولی و جنین شناسی گروه علوم تشریح انجام شده است، لذا از اعضای گروه علوم تشریحی قدردانی می‌شود.

اگر چه مکانیسم دقیق تاثیر متیل سولفونیل متان در مهار رشد سلولی هنوز معلوم نیست ولی مطالعات اولیه نشان داده است که متیل سولفونیل متان با تاثیر بر چرخه‌ی سلولی و افزایش تعداد سلول‌های فاز G2M باعث مرگ سلولی می‌شود (۱۹). در مطالعه‌ای دیگر لیم و همکارانش به بررسی تاثیر متیل سولفونیل متان بر سرطان سینه پرداختند، در این مطالعه مشخص شد متیل سولفونیل متان با کاهش بیان ژن‌های *stat3* و *stat5b* باعث توقف رشد سلول‌های سرطان سینه شدند (۲۰). *stat3* در عود تومور سرطان سینه بعد از برداشتن تومور مهم است و یک فاکتور بهبودی برای سرطان سینه است (۲۸). *Stat5b* عضو مهم دیگری از Stat هاست که رشد، تمایز و بقای تومورهای جامد و سینه‌ای را تنظیم می‌کند. اخیراً گزارش شده که *stat5b* باعث تنظیم واکشن‌های *Igf-1* و *cyclin d1* به محض تحریک هیپوکسی در سلول‌های سرطان سینه می‌شود (۲۹).

مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که غلظت‌های بالای آلیسین باعث کاهش تعداد کلونی‌ها شده است. همچنین تیمار اولیه با متیل سولفونیل متان باعث کاهش تعداد کلونی‌ها نسبت به آلیسین تنهایی می‌شود. سلول‌های $CD44^-$ نسبت به گروه سلول‌های $CD44^+$ مقاومت کمتری نسبت به تیمار با آلیسین و ترکیب دو دارو داشتند، همچنین این سلول‌ها بیشتر دچار نکروز شدند. خواص ضدسرطانی سیر و ترکیبات آن قبلاً گزارش شده است. در یک مطالعه محققان نشان داده اند القای آپوپتوز توسط آلیسین با تغییر بیان پروتئین‌های تنظیم کننده‌ی آپوپتوز در سلول‌های توموری همراه است و متابولیت‌های آلیسین می‌توانند باعث فعال شدن Nf-Kappa-B افزایش سطوح *p53* و *Bax* و کاهش *Bcl-2* در سلول‌های سرطان ریه شوند (۲۶). همچنین در یک مطالعه‌ی دیگر نشان داده شده بود که آلیسین باعث القای آپوپتوز سلولی با واسطه‌ی کاسپاز ۳ و ۸ و ۹ می‌شود. اگر چه تاموکسیفن داروی

References

- 1- Youlden DR, Cramb SM, Dunn NA, Muller JM, Pyke CM, Baade PD. The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiol*. 2012; 36: 237-48.
- 2- Harirchi I, Karbakhsh M, Kashefi A, Momtahn AJ. Breast cancer in Iran: results of a multi-center study. *Asian Pacific J Cancer Prevent. APJCP*. 2004; 5: 24-7.
- 3- Kai K, Arima Y, Kamiya T, Saya H. Breast cancer stem cells. *Breast Cancer*. 2010; 17: 80-5.
- 4- O'Brien CA, Kreso A, Jamieson CH. Cancer stem cells and self-renewal. *Clinical cancer research: Am J Pathol*. 2010; 15; 16: 3113-20.
- 5- Joensuu H, Klemi PJ, Toikkanen S, Jalkanen S. Glycoprotein CD44 expression and its association with survival in breast cancer. *Am J Pathol*. 1993; 143: 867-74.
- 6- Herrera-Gayol A, Jothy S. Adhesion proteins in the biology of breast cancer: contribution of CD44. *J Exper Mol Pathol* 1999; 66: 149-56.
- 7- Bourguignon LY, Peyrollier K, Xia W, Gilad E. Hyaluronan-CD44 interaction activates stem cell marker Nanog, Stat-3-mediated MDR1 gene expression, and ankyrin-regulated multidrug efflux in breast and ovarian tumor cells. *J Biol Chem*. 2008; 283: 17635-51.
- 8- Indran IR, Tufo G, Pervaiz S, Brenner C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1807: 735-45.
- 9- Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3: 768-80.
- 10- Nakagawa H, Tsuta K, Kiuchi K, et al. Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human breast cancer cell lines. *Carcinogenesis*. 2001; 22: 891-7.
- 11- Arzanlou M, Bohlooli S. Inhibition of streptolysin O by allicin - an active component of garlic. *J Med Microbiol*. 2010; 59: 1044-9.
- 12- Ranjbar-Omid M, Arzanlou M, Amani M, Al-Hashem SKS, Mozafari NA, Doghaheh HP. Allicin from garlic inhibits the biofilm formation and urease activity of *Proteus mirabilis* in vitro. *FEMS Microbiol Lett*. 2015; 362: fnv049.
- 13- Arzanlou M, Bohlooli S. Introducing of green garlic plant as a new source of allicin. *Food Chem*. 2010; 120: 179-83.
- 14- Arzanlou M, Bohlooli S, Jannati E, Mirzanejad-Asl H. Allicin from garlic neutralizes the hemolytic activity of intra- and extra-cellular pneumolysin O in vitro. *Toxicon: J Int Soc Toxinol*. 2011; 57: 540-5.
- 15- Arzanlou M, Bohlooli S, Omid MR. Purification of allicin from garlic extract using semi-preparative high performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett*. 2015; 362: 1-9.
- 16- Hirsch K, Danilenko M, Giat J, et al. Effect of purified allicin, the major ingredient offreshly

- crushed garlic, on cancer cell proliferation. *Nut Cancer*. 2000; 38: 245-54.
- 17- Rose SE, Chalk JB, Galloway GJ, Doddrell DM. Detection of dimethyl sulfone in the human brain by in vivo proton magnetic resonance spectroscopy. *Mag Resonance Imag*. 2000; 18: 95-8.
- 18- Engelke UF, Tangerman A, Willemsen MA, et al. Dimethyl sulfone in human cerebrospinal fluid and blood plasma confirmed by one-dimensional (1)H and two-dimensional (1)H-(13)C NMR. *NMR in Biomedicine*. 2005; 18: 331-6.
- 19- Jafari N, Bohlooli S, Mohammadi S, Mazani M. Cytotoxicity of methylsulfonylmethane on gastrointestinal (AGS, HepG2, and KEYSE-30) cancer cell lines. *J Gastroint Cancer*. 2012; 43: 420-5.
- 20- Lim EJ, Hong DY, Park JH, et al. Methylsulfonylmethane suppresses breast cancer growth by down-regulating STAT3 and STAT5b pathways. *PloS one*. 2012; 7: e33361.
- 21- Najafzadeh N, Mazani M, Abbasi A, Farassati F, Amani M. Low-dose all-trans retinoic acid enhances cytotoxicity of cisplatin and 5-fluorouracil on CD44(+) cancer stem cells. *Biomed Pharmacother*. 2015; 74: 243-51.
- 22- Abbasi A, Amani M, Najafzadeh N, Mazani M. Cytotoxic effects of all-trans-retinoic acid with cisplatin on esophageal cancer cell line (KYSE30). *Arak Med Univ J*. 2014; 16: 50-62.
- 23- Najafzadeh N, Abbasi A, Mazani M, Amani M. Effects of all trans retinoic acid combined with cisplatin on survival of gastric cancer cell line (AGS). 2013; 20: 207-214.
- 24- Mahdavi M, Najafzadeh N, Ali Niapour A, Jafari A. Cytotoxicity of ZnO and Ag/ZnO nanocomposites on malignant melanoma cell line (A375). *Arak Med Univ J*. 2014; 17: 74-83.
- 25- Hadizadeh S, Najafzadeh N, Mazani M, Amani M, Mansouri-Torshizi H, Niapour A. Cytotoxic effects of newly synthesized palladium (II) complexes of diethyldithiocarbamate on gastrointestinal cancer cell lines. *Biochem Res Int*. 2014.
- 26- Oommen S, Anto RJ, Srinivas G, Karunakaran D. Allicin (from garlic) induces caspase-mediated apoptosis in cancer cells. *Eur J Pharmacol*. 2004; 485: 97-103.
- 27- Scharfenberg K, Wagner R, Wagner KG. The cytotoxic effect of ajoene, a natural product from garlic, investigated with different cell lines. *Cancer letters*. 1990; 53: 103-8.
- 28- Watson C, Miller W. Elevated levels of members of the STAT family of transcription factors in breast carcinoma nuclear extracts. *Brit Can*. 1995; 71: 840-4.
- 29- Lim EJ, Joung YH, Jung SM, et al. Hemin inhibits cyclin D1 and IGF-1 expression via STAT5b under hypoxia in ERalpha-negative MDA-MB 231 breast cancer cells. *Int J Oncol*. 2010; 36: 1243-51.
- 30- Dorssers LC, Van der Flier S, Brinkman A, et al. Tamoxifen resistance in breast cancer: elucidating mechanisms. *Drugs*. 2001; 61: 1721-33.

Cytotoxicity of Allicin and Methylsulfonylmethane on the Breast Cancer Cell Line (MCF7)

Sarkhani E¹, Najafzadeh N², Mazani M¹, Arzanlou M³, Mohammadzadeh AR⁴

¹Dept. of Biochemistry, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

²Dept. of Anatomy & Pathology, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

³Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

⁴Dept. of Cardiovascular Diseases, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

Corresponding Author: Najafzadeh N, Dept. of Anatomy & Pathology, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran.

E-mail: n.najafzade@arums.ac.ir

Received: 10 Aug 2015 **Accepted:** 11 Jan 2016

Background and Objective: Breast cancer is claimed to be a common cancer amongst women. Estrogen receptors are over-expressed in breast cancer and susceptible to anti-estrogenic effects of tamoxifen. Tamoxifen resistance is a major problem in breast cancer treatment. It has been shown that allicin is an organosulfur compound that is effective in apoptosis induction and cell death in various tumor cell lines. Methylsulfonylmethane (MSM) is non-toxic to the human body whose effect on several cancer lines has been studied. In this study, we assessed the allicin, methylsulfonylmethane and their combined effects on breast cancer cell line (MCF7).

Materials and Methods: Breast cancer cell lines were cultivated in RPMI-1640 and CD44[±] cells were separated using magnetic activated cell sorting (MACS). Then, the effect of different concentrations of allicin, methylsulfonylmethane and their combination were investigated on the isolated cells using MTT, clonogenic assay and Acridine orange/ Ethidium bromide staining methods.

Results: Allicin had cytotoxic consequence on breast cancer cells and its combination with methylsulfonylmethane increased the cytotoxicity and number of apoptotic cells compared to the other groups. Lower colonies were seen in CD44⁻ treated cells in MSM/allicin group compared to CD44⁺ Cells which implies that sensitivity of CD44⁻ cells was higher compared to the CD44⁺ cells.

Conclusion: In this study, we found that allicin and MSM have anticancer effect inhibiting the growth of breast cancer; but combination of low concentrations of allicin with MSM may be more effective in the treatment of breast cancer cells. So, allicin and MSM, as natural products, can be used for medical purposes due to their cytotoxic effect and their availability.

Keywords: Allicin, Methylsulfonylmethane, Breast cancer, Apoptosis, Clonogenic assay